

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : C07K 7/06, 7/56, 7/64 A61K 37/02</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/06943 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Juni 1990 (28.06.90)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01470 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Dezember 1989 (02.12.89) (30) Prioritätsdaten: P 38 41 753.7 12. Dezember 1988 (12.12.88) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BOEHM, Hans-Joachim [DE/DE]; Sinsheimer Strasse 18, D-6700 Ludwigshafen (DE). DAUM, Lothar [DE/DE]; Reiherstrasse 25, D-6701 Otterstadt (DE). HAUPT, Andreas [DE/DE]; Geibelstrasse 66, D-6700 Ludwigshafen (DE). SCHMIED, Bernhard [DE/DE]; Taunusstrasse 20, D-6710 Frankenthal (DE). WALKER, Nigel [GB/DE]; Bergstrasse 5, D-6915 Dossenheim (DE). ZECHEL, Johann-Christian [DE/DE]; Friedrich-Weinbrenner-Strasse 3, D-6900 Heidelberg (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: NOVEL TNF PEPTIDES (54) Bezeichnung: NEUE TNF-PEPTIDE (57) Abstract Peptides derived from TNF, of formula (I): X-A-Gly-Asp-Y, in which A X and Y have the meanings given in the description. Process for producing them. The novel peptides are useful therapeutic agents. (57) Zusammenfassung Es werden von TNF abgeleitete Peptide der Formel (I): X-A-Gly-Asp-Y, worin A Lys, Gln oder Arg ist und X und Y die in der Beschreibung angegebenen Bedeutungen besitzen, sowie deren Herstellung beschrieben. Die neuen Peptide eignen sich zur Bekämpfung von Krankheiten.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

## Neue TNF-Peptide

## Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft neue, vom Tumor Nekrose Faktor (TNF) abgeleitete Peptide, deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel.

Von Carswell et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666, 1975) wurde be-  
 richtet, daß das Serum von Endotoxin-behandelten Tieren, die zuvor mit dem  
 10 Mycobakterien-Stamm Calmette-Guerin (BCG) infiziert worden waren, eine  
 hämorrhagische Nekrose bei verschiedenen Tumoren in der Maus bewirkte.  
 Diese Aktivität wurde dem Tumor Nekrose Faktor zugeschrieben. TNF zeigt  
 auch eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung gegenüber einer Vielzahl  
 von transformierten Zelllinien in vitro, während normale menschliche und  
 15 tierische Zelllinien davon nicht betroffen werden (Lymphokine Reports  
 Vol. 2, pp 235-275, Academic Press, New York, 1981). Kürzlich wurde die  
 biochemische Charakterisierung und das Gen für menschlichen TNF beschrie-  
 ben (Nature 312, 724, 1984; J. Biol. Chem. 260, 2345, 1985; Nucl. Acids  
 Res. 13, 6361, 1985).

20

Aus diesen Daten läßt sich folgende Proteinstruktur für das reife humane  
 TNF ableiten:

ValArgSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisValValAlaAsnPro  
 25 GlnAlaGluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeuLeuAlaAsnGly  
 ValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyrLeuIleTyrSer  
 30 GlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeuThrHisThrIle  
 SerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAlaIleLysSerPro  
 CysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGluProIleTyrLeu  
 35 GlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGluIleAsnArgProAsp  
 TyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIleIleAlaLeu

- 40 Weiterhin wurde das TNF-Gen von Rind, Kaninchen und Maus beschrieben (Cold  
 Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 597, 1986).

Neben seinen zytotoxischen Eigenschaften ist TNF einer der Hauptbeteiligten an entzündlichen Reaktionen (Pharmac. Res. 5, 129, 1988). Im Tiermodell konnte die Beteiligung von TNF beim septischen Schock (Science 229, 869, 1985) und der Graft versus Host Disease (J. Exp. Med. 166, 1280, 5 1987) gezeigt werden.

Es wurde nun gefunden, daß Peptide mit wesentlich geringerem Molekulargewicht günstige Eigenschaften besitzen.

10 Gegenstand der Erfindung sind Peptide der Formel I,



worin

15

A Lys, Gln oder Arg ist,

X für eine Gruppe  $G-NH-CHM-CO-$ ,  $G-NH-CHM-CO-W-$ ,  $G-R-NH-CHM-CO-$  oder  $G-R-NH-CHM-CO-W-$  und

20

Y für eine Gruppe  $-Z$ ,  $-NH-CHQ-CO-Z$ ,  $-V-NH-CHQ-CO-Z$ ,  $-NH-CHQ-CO-U-Z$  oder  $-V-NH-CHQ-CO-U-Z$  steht,

wobei in X und Y

25

G ein Wasserstoffatom oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet,

Z für eine  $OH-$  oder  $NH_2$ -Gruppe oder eine Carboxylschutzgruppe steht oder

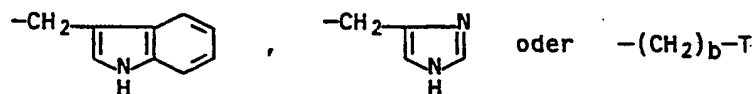
30

G und Z zusammen auch eine kovalente Bindung oder die Gruppe  $-CO-(CH_2)_a-NH-$  bedeuten, wobei a eine Zahl von 1 bis 12 ist,

35 R, U, V und W Peptidketten aus 1-4 natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Aminosäuren darstellen und

M und Q Wasserstoffatome oder eine der Gruppen

$-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH(CH_3)-C_2H_5$ ,  $-C_6H_5$ ,  $-CH(OH)-CH_3$ ,



(mit b in der Bedeutung einer Zahl von 1 bis 6 und T in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms oder einer OH-, CH<sub>3</sub>O-, CH<sub>3</sub>S-, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-, p-HO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-, HS-, H<sub>2</sub>N-, HO-CO-, H<sub>2</sub>N-CO-, H<sub>2</sub>N-C(=NH)-NH-Gruppe) oder

5

M und Q zusammen eine -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>- oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-Brücke (mit c und d in der Bedeutung einer Zahl von 1 bis 4, e und f einer Zahl von 1 bis 6 und g einer Zahl von 1 bis 12) bedeuten,

10

sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

Die Peptide der Formel I sind aus L-Aminosäuren aufgebaut, sie können aber 1 bis 2 D-Aminosäuren enthalten. Die Seitenketten der trifunktionellen 15 Aminosäuren können Schutzgruppen tragen oder ungeschützt vorliegen.

Als physiologisch verträgliche Säuren sind insbesondere zu nennen: Salzsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure, 20 Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Malonsäure, Schwefelsäure, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, Brenztraubensäure, Schleimsäure, Benzoesäure, Glucuronsäure, Oxalsäure, Ascorbinsäure, Acetylglycin.

Die neuen Peptide können offenkettig (G = H, Aminoschutzgruppe; Z = OH, 25 NH<sub>2</sub>, Carboxylschutzgruppe, M und Q nicht miteinander verbunden) und insbesondere Disulfid-verbrückt (G = H, Aminoschutzgruppe; Z = OH, NH<sub>2</sub>, Carboxylschutzgruppe; M + Q = -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-), Seitenketten-verbrückt (G = H, Aminoschutzgruppe, Z = OH, NH<sub>2</sub>, Carboxylschutzgruppe, M + Q = -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>- oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-) 30 oder Kopf-Schwanz-verknüpft (G + Z = kovalente Bindung oder -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH-) sein.

Die neuen Verbindungen lassen sich nach in der Peptidchemie bekannten Methoden herstellen.

35

So kann man die Peptide sequentiell aus Aminosäuren oder durch Fragment-verknüpfung geeigneter kleiner Peptide aufbauen. Beim sequentiellen Aufbau wird die Peptidkette beginnend am C-Terminus stufenweise um jeweils eine Aminosäure verlängert. Bei der Fragmentkupplung können Fragmente 40 unterschiedlicher Länge miteinander verknüpft werden, wobei die Fragmente wiederum durch sequentiellen Aufbau aus Aminosäuren oder ihrerseits durch Fragmentkupplung gewonnen werden können. Die cyclischen Peptide werden nach Synthese der offenkettigen Peptide durch eine in hoher Verdünnung durchgeführte Cyclisierungsreaktion erhalten.

Sowohl beim sequentiellen Aufbau, als auch bei der Fragmentkupplung müssen die Bausteine durch Bildung einer Amidbindung verknüpft werden. Hierzu eignen sich enzymatische und chemische Methoden.

- 5 Chemische Methoden zur Amidbindungsbildung sind ausführlich behandelt bei Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol XV/2, pp 1 - 364, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; Stewart, Young, Solid Phase Peptide Synthesis, pp 31 - 34, 71 - 82, Pierce Chemical Company, Rockford, 1984; Bodanszky, Klausner, Ondetti, Peptide Synthesis, pp 85 - 128, John Wiley & Sons, New York, 1976 und anderen Standardwerken der Peptidchemie. Besonders bevorzugt sind die Azidmethode, die symmetrische und gemischte Anhydridmethode, in situ erzeugte oder präformierte Aktivester und die Amidbindungsbildung mit Hilfe von Kupplungsreagenzien (Aktivatoren), insbesondere Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC), 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDCI), n-Propanphosphorsäureanhydrid (PPA), N,N-Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)amidophosphorsäurechlorid (BOP-Cl), Diphenylphosphorylazid (DPPA), Castro's Reagenz (BOP), O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-Salze (HBTU), 2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid (Steglich's Reagenz; HOTDO) und 1,1'-Carbonyl-diimidazol (CDI). Die Kupplungsreagenzien können allein oder in Kombination mit Additiven wie N,N'-Dimethyl-4-aminopyridin (DMAP), N-Hydroxybenzotriazol (HOBT), N-Hydroxybenzotriazin (HOBTz), N-Hydroxysuccinimid (HOSu) oder 2-Hydroxypyridin eingesetzt werden.
- 25 Während bei der enzymatischen Peptidsynthese normalerweise auf Schutzgruppen verzichtet werden kann, ist für die chemische Synthese ein reversibler Schutz der an der Bildung der Amidbindung nicht beteiligten reaktiven funktionellen Gruppen der beiden Reaktionspartner erforderlich.
- 30 Bei den chemischen Peptidsynthesen werden drei literaturbekannte Schutzgruppentechniken bevorzugt: Die Benzyloxycarbonyl(Z)-, die t-Butyloxycarbonyl(Boc)- und die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppentechnik. Bezeichnet ist jeweils die Schutzgruppe der  $\alpha$ -Aminofunktion des kettenverlängernden Bausteines. Die Seitenkettenschutzgruppen der trifunktionellen Aminosäuren werden so gewählt, daß sie nicht notwendigerweise zusammen mit der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe abgespalten werden. Eine ausführliche Übersicht über Aminosäureschutzgruppen gibt Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol XV/1, pp 20 - 906, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974.
- 40 Die Bausteine, die dem Aufbau der Peptidkette dienen, können in Lösung, in Suspension oder nach einem ähnlichen Verfahren, wie es von Merrifield in J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149, 1963 beschrieben ist, zur Reaktion gebracht werden. Besonders bevorzugt sind Verfahren, bei denen Peptide sequentiell oder durch Fragmentkupplung unter Verwendung der Z-, Boc- oder

Fmoc-Schutzgruppentechnik aufgebaut werden, wobei die Reaktionspartner in Lösung zur Reaktion gebracht werden, sowie Verfahren, bei denen, ähnlich der genannten Merrifield-Technik, ein Reaktionspartner an einen unlöslichen polymeren Träger (im folgenden auch Harz genannt) gebunden zur  
5 Reaktion gebracht wird. Dabei wird das Peptid typischerweise unter Verwendung der Boc- oder Fmoc-Schutzgruppentechnik sequentiell am polymeren Träger aufgebaut, wobei die wachsende Peptidkette am C-Terminus kovalent mit den unlöslichen Harzteilen verbunden ist (vgl. Abb. 1 und 2). Diese Arbeitsweise erlaubt es, Reagentien und Nebenprodukte durch Filtration zu  
10 entfernen, die Umkristallisation von Zwischenprodukten wird somit überflüssig.

Die geschützten Aminosäuren können an beliebige geeignete Polymerisate gebunden werden, die lediglich in den verwendeten Lösungsmitteln unlöslich  
15 sein und eine beständige physikalische Form, die leichte Filtration ermöglicht, aufweisen müssen. Das Polymerisat muß eine funktionelle Gruppe enthalten, an die die erste geschützte Aminosäure durch eine kovalente Bindung fest gebunden werden kann. Für diesen Zweck eignen sich die verschiedensten Polymerisate, z.B. Cellulose, Polyvinylalkohol, Polymeth-  
20 acrylat, sulfoniertes Polystyrol, chlormethyliertes Copolymerisat von Styrol und Divinylbenzol (Merrifield-Harz), 4-Methylbenzhydrylamin-Harz (MBHA-Harz), Phenylacetamidomethyl-Harz (Pam-Harz), p-Benzoyloxybenzylalkohol-Harz, Benzhydrylamin-Harz (BHA-Harz), 4-(Hydroxymethyl)-benzoyloxymethyl-Harz, Harz nach Breipohl et al. (Tetrahedron Lett. 28, 565,  
25 1987; Fa. BACHEM), HYCRAM-Harz (Fa. ORPEGEN) oder SASRIN-Harz (Fa. BACHEM).

Für die Peptidsynthese in Lösung eignen sich alle Lösungsmittel, die sich unter den Reaktionsbedingungen als inert erweisen, insbesondere Wasser,  
30 N,N'-Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril, Dichlormethan (DCM), 1,4-Dioxan, Tetrahydrofuran (THF), N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) sowie Gemische der genannten Lösungsmittel. Die Peptidsynthese am polymeren Träger kann in allen inerten organischen Lösungsmitteln, in denen die verwendeten Aminosäurederivate löslich sind, durchgeführt  
35 werden; bevorzugt sind jedoch Lösungsmittel, die zusätzlich harzquellende Eigenschaften besitzen, wie DMF, DCM, NMP, Acetonitril und DMSO, sowie Gemische dieser Lösungsmittel.

Nach erfolgreicher Synthese wird das Peptid vom polymeren Träger  
40 abgespalten. Die Bedingungen, unter denen sich die verschiedenen Harztypen abspalten lassen, sind literaturbekannt. Am häufigsten finden saure und Palladium-katalysierte Spaltreaktionen Anwendung, insbesondere die Spaltung in flüssigem wasserfreiem Fluorwasserstoff, in wasserfreier Trifluormethansulfonsäure, in verdünnter oder konzentrierter

Trifluoressigsäure oder die Palladium-katalysierte Spaltung in THF oder THF-DCM-Gemischen in Anwesenheit einer schwachen Base wie z.B. Morpholin. Je nach Wahl der Schutzgruppen können diese unter den Spaltbedingungen erhalten bleiben oder ebenfalls abgespalten werden. Auch eine teilweise  
5 Entschüttung des Peptids kann sinnvoll sein, wenn bestimmte Derivatisierungsreaktionen oder eine Cyclisierung durchgeführt werden sollen.

Die neuen Peptide zeigen zum Teil gute zytotoxische Eigenschaften. Ein anderer Teil der Peptide besitzt eine hohe Affinität für den zellulären  
10 TNF-Rezeptor, ohne jedoch eine zytotoxische Aktivität zu besitzen. Sie stellen also TNF-Antagonisten dar. Sie binden in Konkurrenz zu natürlichem TNF an den zellulären TNF-Rezeptor und unterdrücken so die TNF-Wirkung. Die neuen Peptide erweisen sich als wertvolle Arzneimittel, die zur Behandlung von neoplastischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen sowie  
15 zur Bekämpfung und Prophylaxe von Infektionen, Entzündungen und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen eingesetzt werden können. Durch einfache Experimente kann geklärt werden, welche Wirkungsweise die einzelnen Peptide besitzen. Mit einer TNF-sensitiven Zelle wird die Zytotoxizität des Peptids durch Inkubation der Zelllinie in Gegenwart des  
20 Peptids bestimmt. In einem zweiten Versuchsansatz inkubiert man die Zelllinie mit dem entsprechenden Peptid in Gegenwart einer letal wirkenden TNF-Menge. Dadurch kann die TNF-antagonisierende Wirkung nachgewiesen werden. Außerdem wird durch ein in vitro Bindungsexperiment die Affinität des Peptids zum zellulären TNF-Rezeptor bestimmt.

25

Die biologische Charakterisierung der neuen Peptide auf ihre agonistische oder antagonistische Wirkung erfolgte in folgenden Testsystemen:

Zytotoxizitätstest auf TNF-sensitiven Indikatorzellen,

30 I.

Kompetition-Zytotoxizitätstest auf TNF-sensitiven

II.

Indikatorzellen,

III. Kompetition-Rezeptorbindungstest auf TNF-Rezeptor exprimierenden  
35 Indikatorzellen.

I. Zytotoxizitätstest

Die agonistische Bewertung der neuen Peptide basiert auf deren  
40 zytotoxischer Wirkung auf TNF-sensitiven Zellen (z.B. L929, MCF-7, A204, U937). Der Test mit L929 und MCF-7 wurde wie folgt durchgeführt:



1. 100 µl Kulturmedium mit 3 bis 5 x 10<sup>3</sup> frisch trypsinisierten, sich im exponentiellen Wachstum befindenden L929-Zellen (Maus) bzw. MCF-7-Zellen (Mensch) wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die mit Wasserdampf gesättigte Luft im Brutschrank enthielt 5 Vol% CO<sub>2</sub>.

Das L929-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Earle 1x (Boehringer, Mannheim), 50 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) foetales Kälberserum (FCS), 50 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren, 3 ml 1M Hepes-Puffer pH 7,2 und 50 ml Gentamycin (50 mg/ml).

Das MCF-7-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Dulbecco 1x (Boehringer, Mannheim), 100 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS, 5 ml L-Glutamin und 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren.

2. Am folgenden Tag wurden 100 µl der zu prüfenden Peptid-Lösung zu den Zellkulturen gegeben und seriell 2-fach titriert. Zusätzlich wurden einige Zellkontrollen (d.h. nicht mit Peptid-Verdünnung behandelte Zellkulturen) und einige rhu-TNF-Kontrollen (d.h. mit rekombinanten humanen TNF behandelte Zellkulturen) mit angelegt. Die Kulturplatte wurde 48 h bei 37°C in einer Atmosphäre aus wasserdampf-gesättigter Luft mit 5 Vol.% CO<sub>2</sub> inkubiert.

3. Der Prozentsatz überlebender Zellen in den mit Peptid-Verdünnung behandelten Kulturen wurde mittels der Kristallviolett-färbung bestimmt. Dazu wurden die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen durch Abschlagen der Testplatte entfernt. In jede Vertiefung wurden 50 µl Kristallviolettlösungen pipettiert.

Die Kristallviolettlösung hatte folgende Zusammensetzung:

3,75 g Kristallviolett  
1,75 g NaCl  
161,5 ml Ethanol  
43,2 ml 37 % Formaldehyd  
ad 500 ml Wasser

- Die Kristallviolettlösung blieb 20 min in den Vertiefungen und wurde dann ebenfalls abgeschlagen. Anschließend wurden die Platten jeweils 5 mal durch Eintauchen in Wasser gewaschen, um

den nicht zellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Der zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl Reagenzlösung (50 % Ethanol, 0,1 % Eisessig, 49,9 % Wasser) in jede Vertiefung aus den Zellen extrahiert.

5

4. Durch Schütteln der Platten für 5 min erhielt man in jeder Vertiefung eine gleichmäßig gefärbte Lösung. Zur Bestimmung der überlebenden Zellen wurde die Extinktion der Färbelösung in den einzelnen Vertiefungen bei 540 nm gemessen.

10

5. Danach wurde, bezogen auf die Zellkontrolle, der 50 % Zytotoxizitätswert definiert und der Kehrwert der Probenverdünnung, die zu 50 % Zytotoxizität führt, als zytotoxische Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.

15

## II. Konkurrenz-Zytotoxizitätstest

Die antagonistische Bewertung der Peptide basiert auf deren Eigenschaft, die zytotoxische Wirkung von rhu-TNF auf TNF-sensitiven Zellen (z.B. L929, MCF-7, A204, U937) zu konkurrieren. Der Konkurrenz-Zytotoxizitätstest mit L929 und MCF-7-Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

20

25

1. 100 µl Kulturmedium mit 3 bis 5 x 10<sup>3</sup> frisch trypsinisierten, sich im exponentiellen Wachstum befindenden L929-Zellen (Maus) bzw. MCF-7-Zellen (Mensch) wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Kulturplatte pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die mit Wasserdampf gesättigte Luft im Brutschrank enthielt 5 Vol% CO<sub>2</sub>.

30

Das L929-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Earle 1x (Boehringer, Mannheim), 50 ml für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren, 3 ml 1M HEPES-Puffer pH 7,2 und 500 µl Gentamycin (50 mg/ml).

35

Das MCF-7-Kulturmedium enthielt 500 ml MEM Dulbecco 1x (Boehringer, Mannheim), 100 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS, 5 ml L-Glutamin (200 mM) und 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren.

40

2. Am nächsten Tag wurden 100 µl der zu prüfenden Peptid-Lösung zu den Zellkulturen zugegeben und seriell 2-fach titriert. Zu diesen Zellkulturen wurden dann 100 µl einer rhu-TNF-Verdünnung in Kulturmedium, die in der Endkonzentration in der Zellkultur eine

- 5 80-100 % zytotoxische Wirkung hat, zugegeben. Zudem wurden einige Zellkontrollen (d.h. nicht mit Peptid-Lösung und nicht mit rhu-TNF-Lösung behandelte Zellkulturen) und einige rhu-TNF-Kontrollen (=nur mit rhu-TNF-Lösung behandelte Zellkulturen) mit angelegt. Die Kulturplatte wurde dann 48 h bei 37°C in einer Atmosphäre aus wasserdampf-gesättigter Luft mit 5 Vol.% CO<sub>2</sub> inkubiert.
- 10 3. Der Prozentsatz Überlebender Zellen in den mit Substanzlösung behandelten Kulturen wurde mittels der Kristallviolett-Färbung bestimmt. Dazu wurden die Flüssigkeiten aus den Vertiefungen durch Abschlagen der Testplatte entfernt. In jede Vertiefung wurden 50 µl Kristallviolettlösungen pipettiert.
- 15 Die Kristallviolettlösung hatte die in II.3 angegebene Zusammensetzung.
- 20 Die Kristallviolettlösung blieb 20 min in den Vertiefungen und wurde dann ebenfalls abgeschlagen. Anschließend wurden die Platten jeweils 5 mal durch Eintauchen in Wasser gewaschen, um den nicht zellgebundenen Farbstoff zu entfernen. Der zellgebundene Farbstoff wurde durch Zugabe von 100 µl Reagenzlösung (50 % Ethanol, 0,1 % Eisessig, 49,9 % Wasser) in jede Vertiefung aus den Zellen extrahiert.
- 25 4. Durch Schütteln der Platten für 5 min erhielt man in jeder Vertiefung eine gleichmäßig gefärbte Lösung. Zur Bestimmung der überlebenden Zellen wurde die Extinktion der Färbelösung in den einzelnen Vertiefungen bei 540 nm gemessen.
- 30 5. Danach wurde, bezogen auf die Zellkontrolle und die rhu-TNF-Kontrolle der 50 % Kompetitionswert definiert und die Probenkonzentration, die bei der vorgelegten rhu-TNF-Konzentration zu 50 % Konkurrenz der rhu-TNF-Zytotoxizität führt, als antagonistische Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.
- 35

### III. Konkurrenz-Rezeptorbindungstest

- 40 Sowohl die agonistische als auch die antagonistische Wirkung von Peptiden setzt voraus, daß letztere an den TNF-Rezeptor binden. Das bedeutet, daß Peptide mit agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung und rhu-TNF um die Bindung am TNF-Rezeptor auf TNF-sensitiven Indikatorzellen (z.B. U937) konkurrieren. Der Konkurrenz-Rezeptorbindungstest wurde wie folgt durchgeführt:

1. 100  $\mu$ l Medium mit verschiedenen Konzentrationen des zu prüfenden Peptids sowie des rhu-TNF (=Kontrolle) wurden in die Reaktionsgefäße pipettiert. Das Medium enthielt 500 ml PBS (Boehringer, Mannheim), 10 ml hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) FCS und 100 mg Natriumazid.  
5
2. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Medium mit 1 ng  $^{125}$ Jod-markiertem rhu-TNF (Lactoperoxidase-Methode nach Bolton) in die Reaktionsgefäße gegeben und gemischt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (NSB) wurde in den Reaktionsgefäßen das  $^{125}$ Jod-markierte rhu-TNF (1 ng  $^{125}$ J-rhu-TNF in 100  $\mu$ l Medium) mit dem 200-fachen Überschuß an nicht radioaktiv markiertem rhu-TNF (200 ng rhu-TNF in 100  $\mu$ l Medium) gemischt.  
10
3. Dann wurden 100  $\mu$ l Medium mit  $2 \times 10^6$  U937-Zellen (Mensch) in die Reaktionsgefäße pipettiert und gemischt. Die Reaktionsgefäße (Testvolumen 300  $\mu$ l) wurden 90 min bei 0°C inkubiert. Nach 45 min wurden die Reaktionsansätze nochmals durchmischt.  
15
4. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 5 min bei 1800 rpm und 4°C zentrifugiert, 3 mal mit Medium gewaschen, quantitativ in Zählröhrchen überführt und die zellgebundene Radioaktivität in einem Clini Gamma Counter 1272 (LKB Wallac) bestimmt.  
20
5. Nach Korrektur der Meßwerte um die unspezifische Bindung wurde, bezogen auf die Gesamtbindung, der 50 % Kompetitionswert definiert und die Probenkonzentration, die bei der vorgelegten  $^{125}$ J-rhu-TNF-Konzentration zu 50 % Kompetition der  $^{125}$ J-rhu-TNF-Bindung führt, als kompetitive Aktivität der untersuchten Probe ermittelt.  
25  
30

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern. Die proteogenen Aminosäuren sind in den Beispielen mit dem bekannten Dreibuchstaben-Code abgekürzt. Darüber hinaus bedeuten: Aad =  $\alpha$ -Amino-  
35 adipinsäure, Abs = 4-Aminobuttersäure, Ac = Essigsäure, Ade = 10-Amino-  
dekansäure, Ahp = 7-Aminoheptansäure, Hcy = Homocystein, Hly = Homolysin,  
Orn = Ornithin, Dap = 2,3-Diaminopropionsäure.

#### A. Allgemeine Arbeitsvorschriften

40

- I. Die Synthese der Peptide gemäß Anspruch 1 erfolgte mit Hilfe der Standardmethoden der Festphasenpeptidsynthese an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer Modell 430A der Firma APPLIED BIOSYSTEMS. Das Gerät benutzt für die Boc- und Fmoc-Schutzgruppentechnik unterschiedliche Synthesezyklen.

## a) Synthesesyklus für die Boc-Schutzgruppentechnik

	1. 30 % Trifluoressigsäure in DCM	1 x 3 min
	2. 50 % Trifluoressigsäure in DCM	1 x 17 min
5	3. DCM-Waschschrift	5 x 1 min
	4. 5 % Diisopropylethylamin in DCM	1 x 1 min
	5. 5 % Diisopropylethylamin in NMP	1 x 1 min
	6. NMP-Waschschrift	5 x 1 min
10	7. Zugabe der voraktivierten geschützten Aminosäure (Aktivierung durch 1 Äquivalent DCC und 1 Äquivalent HOBt in NMP/DCM); Peptidkupplung (1. Teil)	1 x 30 min
	8. Zugabe von DMSO zur Reaktionsmischung bis zu einem Volumenanteil von 20 % DMSO	
15	9. Peptidkupplung (2. Teil)	1 x 16 min
	10. Zugabe von 3,8 Äquivalenten Diisopropylethylamin zur Reaktionsmischung	
	11. Peptidkupplung (3. Teil)	1 x 7 min
	12. DCM-Waschschrift	3 x 1 min
20	13. bei unvollständigem Umsatz Wiederholung der Kupplung (zurück zu 5.)	
	14. 10 % Essigsäureanhydrid, 5 % Diisopropylethylamin in DCM	1 x 2 min
	15. 10 % Essigsäureanhydrid in DCM	1 x 4 min
25	16. DCM-Waschschrift	4 x 1 min
	17. zurück zu 1.	

## b) Synthesesyklus für die Fmoc-Schutzgruppentechnik

30	1. NMP-Waschschrift	1 x 1 min
	2. 20 % Piperidin in NMP	1 x 4 min
	3. 20 % Piperidin in NMP	1 x 16 min
	4. NMP-Waschschrift	5 x 1 min
35	5. Zugabe der voraktivierten geschützten Aminosäure (Aktivierung durch 1 Äquivalent DCC und 1 Äquivalent HOBt in NMP/DCM); Peptidkupplung	1 x 61 min
	6. NMP-Waschschrift	3 x 1 min
40	7. bei unvollständigem Umsatz Wiederholung der Kupplung (zurück zu 5.)	
	8. 10 % Essigsäureanhydrid in NMP	1 x 8 min
	9. NMP-Waschschrift	3 x 1 min
	10. zurück zu 2.	

## II. Aufarbeitung der nach Ia erhaltenen Peptidharze

Das nach Ia erhaltene Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet und in ein Reaktionsgefäß einer Teflon-HF-Apparatur (Fa. PENINSULA) transferiert. Nach Zugabe eines Scavengers, vorzugsweise Anisol (1 ml/g Harz), sowie im Falle von tryptophanhaltigen Peptiden eines Thiols zur Entfernung der indolischen Formylgruppe, vorzugsweise Ethandithiol (0,5 ml/g Harz) wurde unter Kühlung mit flüssigem N<sub>2</sub> Fluorwasserstoff einkondensiert (10 ml/g Harz). Man ließ die Mischung sich auf 0°C erwärmen und rührte 45 min bei dieser Temperatur. Anschließend wurde der Fluorwasserstoff im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit Essigester gewaschen, um restlichen Scavenger zu entfernen. Das Peptid wurde mit 30 %iger Essigsäure extrahiert, filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

Zur Herstellung von Peptidhydraziden wurde das Peptidharz (Pam- oder Merrifieldharz) in DMF suspendiert (15 ml/g Harz) und nach Versetzen mit Hydrazinhydrat (20 Äquivalente) 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Harz abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde aus DMF/Et<sub>2</sub>O oder MeOH/Et<sub>2</sub>O kristallisiert.

## III. Aufarbeitung der nach Ib erhaltenen Peptidharze

Das gemäß Ib erhaltene Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in Abhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung einer der folgenden Spaltungsprozeduren unterworfen (Wade, Tregear, Howard Florey Fmoc-Workshop Manual, Melbourne 1985).

Das Peptid enthält			Spaltbedingungen		
Arg(Mtr)	Met	Trp	TFA	Scavenger	Reaktionszeit
nein	nein	nein	95 %	5 % H <sub>2</sub> O	1,5 h
ja	nein	nein	95 %	5 % Thioanisol	≥ 3 h
nein	ja	nein	95 %	5 % Ethylmethyl- sulfid	1,5 h
nein	nein	ja	95 %	5 % Ethandithiol/ Anisol (1:3)	1,5 h
nein	ja	ja	95 %	5 % Ethandithiol/ Anisol/Ethyl- methylsulfid (1:3:1)	1,5 h
ja	ja	ja	93 %	7 % Ethandithiol/ Anisol/ Ethylmethyl- sulfid (1:3:3)	≥ 3 h

- Die Suspension des Peptidharzes in der geeigneten TFA-Mischung wurde bei Raumtemperatur für die angegebene Zeit gerührt, danach wurde das Harz abfiltriert und mit TFA sowie DCM gewaschen. Das Filtrat und die
- 5 Waschlösungen wurden weitgehend eingengt und das Peptid durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Nach Abkühlung im Eisbad wurde der Niederschlag abfiltriert, in 30 % Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

#### 10 IV. Reinigung und Charakterisierung der Peptide

- Die Reinigung erfolgte mittels Gelchromatographie (SEPHADEX® G-10, G-15/10 % HOAc; SEPHADEX® LH20/MeOH) und anschließender Mittel-
- 15 druckchromatographie (Stationäre Phase: HD-SIL C-18, 20-45 µ, 100 Å; mobile Phase: Gradient mit A = 0,1 % TFA/MeOH, B = 0,1 % TFA/H<sub>2</sub>O).

Die Reinheit der erhaltenen Endprodukte wurde mit analytischer HPLC (Stationäre Phase: 100 x 2,1 mm VYDAC C-18, 5  $\mu$ , 300 Å; mobile Phase = CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O-Gradient, gepuffert mit 0,1 % TFA, 40°C) bestimmt. Zur Charakterisierung wurden Aminosäureanalyse und Fast-Atom-Bombardment-Massenspektroskopie herangezogen.

## B. Spezielle Arbeitsvorschriften

### Beispiel 1

10

Ac-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>

1,47 g Boc-Arg(Tos)-MBHA-Harz (Substitution ~ 0,34 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol, wurden gemäß A1a mit je 2 mmol

15

Boc-Asp(OChx)-OH

Boc-Glu(OChx)-OH

Boc-Gly-OH

Boc-Leu-OH

Boc-Lys(Cl-Z)-OH

20 umgesetzt.

Nach beendeter Synthese wurde der N-Terminus acetyliert. (Ausführung der Schritte 1 - 6 und 14 - 16 gemäß A1a). Das Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet; die Ausbeute betrug 1,87 g.

25

Das so erhaltene Harz wurde einer HF-Spaltung gemäß A11 unterworfen. Das Rohprodukt (181 mg) wurde durch Gelfiltration (SEPHADEX® G-10) und Mitteldruckchromatographie (vgl. A1V; 5 - 20 % A; 0,25 % min<sup>-1</sup>) gereinigt. Es wurden 78 mg Reinprodukt erhalten.

30

### Beispiel 2

H-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-OH

35 0,47 g Fmoc-Leu-p-Alkoxybenzylalkoholharz (Substitution ~ 0,53 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,25 mmol; wurden gemäß A1b mit je 1 mmol

Fmoc-Arg(Mtr)-OH

Fmoc-Glu(OtBu)-OH

40 Fmoc-Asp(OtBu)-OH

Fmoc-Gln-OH

Fmoc-Gly-OH

Fmoc-Phe-OH

Fmoc-Lys(Boc)-OH

umgesetzt.



Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz N-terminal entschützt (Ausführung der Schritte 2 - 4 gemäß A1b), und im Vakuum getrocknet; die Ausbeute betrug 0,75 g.

5 Das nach der TFA-Spaltung gemäß AIII erhaltene Rohpeptid (212 mg) wurde durch Gelfiltration (SEPHADEX® G - 10) und Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 5 - 25 %; 0,25 % min<sup>-1</sup>) gereinigt. Es wurden 136 mg Reinprodukt erhalten.

10 Analog Beispiel 1 und 2 lassen sich herstellen:

3. H-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-OH
4. Ac-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-OH
5. Ac-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
- 15 6. H-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-OH
7. H-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
8. H-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-OH
9. Ac-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-OH
10. H-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
- 20 11. Ac-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
12. H-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-OH
13. Ac-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-OH
14. H-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
15. Ac-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
- 25 16. Ac-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>
17. H-Leu-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-OH
18. Ac-Leu-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>
19. H-Gln-Leu-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Ser-OH
20. Ac-Gln-Leu-Phe-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Ser-NH<sub>2</sub>
- 30 21. H-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Lys-OH
22. Ac-Leu-Asp-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
23. Ac-Leu-Glu-D-Lys-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
24. Ac-Phe-Gln-Glu-Gln-Gly-Asp-Arg-NH<sub>2</sub>
25. H-Gln-Leu-Tyr-Gln-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Ser-OH
- 35

Beispiel 26



0,41 g Boc-Hcy(pMB)-MBHA-Harz (Substitution ~ 1,24 mmol/g), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol wurden gemäß A1a mit je 2 mmol

Boc-Arg(Tos)-OH  
 Boc-Asp(OChx)-OH  
 Boc-Gly-OH  
 Boc-Lys(Cl-Z)-OH

Boc-Glu(OChx)-OH  
 Boc-Leu-OH  
 Boc-Gln-OH  
 Boc-Hcy-(pMB)-OH

5

umgesetzt.

Nach beendeter Synthese wurde der N-Terminus acetyliert (Ausführung der Schritte 1 - 6 und 14 - 16 gemäß A1a). Das Peptidharz wurde im Vakuum 10 getrocknet; die Ausbeute betrug 1,1 g.

Das so erhaltene Harz wurde einer HF-Spaltung gemäß AII unterworfen. Das lyophilisierte Rohprodukt wurde in 2 l 0,1 %iger Essigsäure aufgenommen und der pH anschließend mit wäßrigem Ammoniak auf 8,4 eingestellt. Unter 15 Argonatmosphäre wurde langsam 0,01 n  $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung zugetropft, bis die gelblich-grüne Färbung länger als 15 min bestehen blieb. Es wurde noch 1 h nachgerührt, dann mit Eisessig auf pH 4,5 angesäuert und mit 15 ml einer wäßrigen Suspension eines Anionenaustauschers (BIORAD® 3 x 4A, Chloridform) versetzt. Nach 30 min wurde das Ionenaustauscherharz 20 abfiltriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingengt und anschließend lyophilisiert.

Alle benutzten Lösungsmittel wurden vorher mit Stickstoff gesättigt, um eventuelle Oxidation der freien Cysteinreste zu verhindern.

25

Das Rohprodukt wurde durch Gelchromatographie (SEPHADEX® G-15) und Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 30 - 60 % A; 0,25 % min<sup>-1</sup>) gereinigt. Es wurden 15 mg Reinprodukt erhalten.

30 Analog Beispiel 26 lassen sich herstellen (zur Herstellung der Peptidsäuren wurde PAM-Harz verwendet):

27. H-Cys-Lys-Gly-Asp-Cys-OH

28. H-Cys-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-OH

29. Ac-Cys-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-NH<sub>2</sub>

30. H-Hcy-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Hcy-OH

31. Ac-Hcy-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Hcy-NH<sub>2</sub>

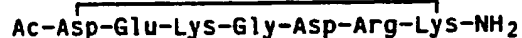
32. Ac-Cys-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-NH<sub>2</sub>

33. Ac-Hcy-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Hcy-NH<sub>2</sub>

34. Ac-Cys-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Cys-NH<sub>2</sub>

35. Ac-Hcy-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Hcy-NH<sub>2</sub>
36. Ac-Cys-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Cys-NH<sub>2</sub>
37. Ac-Hcy-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Hcy-NH<sub>2</sub>
38. H-Cys-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-OH
39. Ac-Cys-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-NH<sub>2</sub>
40. H-Hcy-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-OH
41. Ac-Hcy-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-NH<sub>2</sub>
42. H-Cys-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Hcy-OH
43. H-Hcy-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Hcy-OH
44. Ac-Hcy-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Hcy-NH<sub>2</sub>
45. Ac-Gln-Leu-Cys-Lys-Gly-Asp-Cys-Leu-Ser-NH<sub>2</sub>
46. Ac-Hcy-Glu-Arg-Gly-Asp-Hcy-NH<sub>2</sub>
47. Ac-Phe-Gln-Hcy-Glu-Lys-Gly-Asp-Hcy-Leu-Ser-Ala-NH<sub>2</sub>
48. H-Cys-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Lys-Cys-OH
49. H-Cys-Leu-Glu-D-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-OH
50. Ac-Cys-Leu-Asp-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Cys-NH<sub>2</sub>
51. Ac-Cys-Bal-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-NH<sub>2</sub>
52. Ac-Cys-Gly-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Cys-NH<sub>2</sub>
53. Ac-Cys-Glu-Lys-Gly-Asp-Cys-NH<sub>2</sub>
54. Ac-Cys-Gly-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>

#### Beispiel 55



1 g Harz nach Breipohl et al. (Fa. BACHEM), entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol wurde gemäß A1b mit je 2 mmol

Fmoc-Lys(Boc)-OH  
 Fmoc-Arg(Tos)-OH  
 Fmoc-Asp(OChx)-OH  
 Fmoc-Gly-OH

Fmoc-Lys(Z)-OH  
 Fmoc-Glu(OBzl)-OH  
 Fmoc-Asp(OtBu)-OH

5

umgesetzt. Nach beendeter Synthese wurde der N-Terminus acetyliert (Ausführung der Schritte 2 - 4 und 8 - 9 gemäß A1b). Das Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet; Ausbeute 1,64 g.

- 10 Das nach der TFA-Spaltung gemäß AIII erhaltene Rohprodukt (592 mg) wurde in 500 ml entgastem DMF gelöst; zu dieser Lösung wurden bei -15°C 61,1 mg (0,5 mmol) DMAP und 1,92 g (40 mmol) EDCI gegeben. Anschließend wurde 2 Tage bei -15°C, 2 Tage bei 0°C und 2 Tage bei RT aufbewahrt. Zur Aufarbeitung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit Wasser 15 digeriert. Das ausgefallene Peptid wurde abfiltriert, mehrfach mit 5 % Citronensäure und Wasser gewaschen und nach Trocknung (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) durch Gelchromatographie (SEPHADEX® LH 20) gereinigt. Das isolierte und gut getrocknete Monomere (183 g) wurde einer HF-Spaltung gemäß AII unterworfen und anschließend durch Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 20 - 40 % A; 20 0,25 % min<sup>-1</sup>) gereinigt. Es wurden 121 mg Reinprodukt erhalten.

#### Beispiel 56

Ac-Asp-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Lys-OH

- 25 1,47 g Fmoc-Lys(Boc)-Merrifield-Harz (Substitution - 0,34 mmol/g) entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol, wurden gemäß A1b mit je 2 mmol

30 Fmoc-Arg(Tos)-OH  
 Fmoc-Asp(OChx)-OH  
 Fmoc-Gly-OH

Fmoc-Lys(Z)-OH  
 Fmoc-Glu(OBzl)-OH  
 Fmoc-Asp(OtBu)-OH

umgesetzt. Der N-Terminus wurde acetyliert (Ausführung der Schritte 2-4 und 8-9 gemäß A1b).

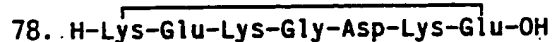
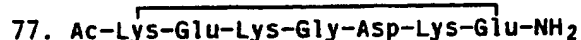
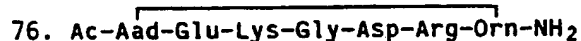
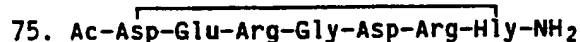
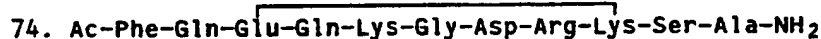
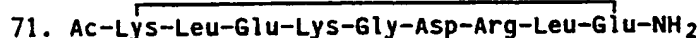
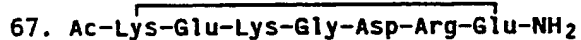
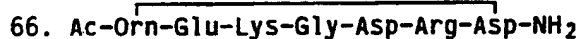
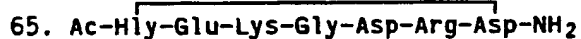
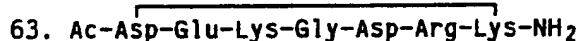
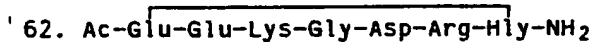
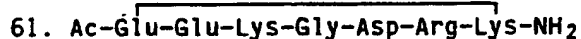
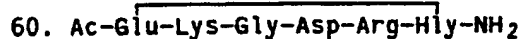
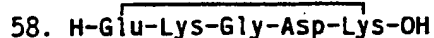
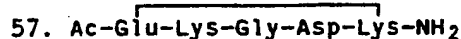
35

Anschließend wurden die t-Butyl- und Boc-Schutzgruppen abgespalten (Ausführung der Schritte 1-6 gemäß A1a). Die Zyklisierung am Harz erfolgte in NMP unter Zugabe von 0,89 g BOP und 0,87 ml Diisopropylethylamin (48 h). Die Ausbeute betrug 1,85 g.

40

Das nach HF-Spaltung gemäß AII erhaltene Rohprodukt wurde durch Gel-filtration (Sephadex® G-15) und Mitteldruckchromatographie (vgl. AIV; 15-35 %; 0,25 min<sup>-1</sup>) gereinigt. Es wurden 14 mg Reinprodukt erhalten.

Analog Beispiel 55 und 56 lassen sich herstellen:



## Beispiel 79

Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Aoc

0,92 g Fmoc-Gly-p-Alkoxybenzylalkohol-Harz (Substitution ~ 0,53 mmol/g),  
entsprechend einer Ansatzgröße von 0,5 mmol, wurde gemäß A1b mit je 2 mmol

5 Fmoc-Lys(Z)-OH  
Fmoc-Glu(OCHx)-OH  
Fmoc-Leu-OH

Fmoc-Aoc-OH  
Fmoc-Asp(OCHx)-OH

umgesetzt. Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz im Vakuum  
10 getrocknet. Die Ausbeute betrug 1,43 g.

Das nach TFA-Spaltung gemäß AIII erhaltene Rohpeptid wurde in 500 ml  
entgastem DMF gelöst und analog Beispiel 55 umgesetzt und aufgearbeitet.  
Es wurden 97 mg Reinprodukt erhalten.

15

Analog Beispiel 79 lassen sich herstellen:

80. D-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg
81. Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Ade
82. Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu
83. Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Ahp
84. Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Abs
85. Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Ser
86. Leu-Glu-D-Lys-Gly-Asp-Arg
87. Asp-Lys-Gly-Asp-Arg-Ade
88. Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Lys-Ahp
89. D-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu
90. Phe-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Ser-Gly
91. Phe-Gln-Leu-Glu-Lys-Gly-Asp-Arg-Leu-Ser-Bal

## Patentansprüche

1. Gegenstand der Erfindung sind Peptide der Formel I,

5 X-A-Gly-Asp-Y I,

worin

10 A Lys, Gln oder Arg ist,

X für eine Gruppe G-NH-CHM-CO-, G-NH-CHM-CO-W-, G-R-NH-CHM-CO- oder G-R-NH-CHM-CO-W- und

15 Y für eine Gruppe -Z, -NH-CHQ-CO-Z, -V-NH-CHQ-CO-Z, -NH-CHQ-CO-U-Z oder -V-NH-CHQ-CO-U-Z steht,

wobei in X und Y

20 G ein Wasserstoffatom oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet,

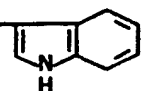
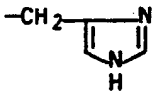
Z für eine OH- oder NH<sub>2</sub>-Gruppe oder eine Carboxylschutzgruppe steht oder

25 G und Z zusammen auch eine kovalente Bindung oder die Gruppe -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH- bedeuten, wobei a eine Zahl von 1 bis 12 ist,

R, U, V und W Peptidketten aus 1-4 natürlich vorkommenden α-Aminosäuren darstellen und

30 M und Q Wasserstoffatome oder eine der Gruppen

-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -CH(OH)-CH<sub>3</sub>,

-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>- oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-T

(mit b in der Bedeutung einer Zahl von 1 bis 6 und T in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms oder einer OH-, CH<sub>3</sub>O-, CH<sub>3</sub>S-, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-, p-HO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-, HS-, H<sub>2</sub>N-, HO-CO-, H<sub>2</sub>N-CO-, H<sub>2</sub>N-C(=NH)-NH-Gruppe) oder

35

Abb.

M und Q zusammen eine  $-(CH_2)_c-S-S-(CH_2)_d-$ ,  $-(CH_2)_e-CO-NH-(CH_2)_f-$  oder  $-(CH_2)_e-NH-CO-(CH_2)_g-NH-CO-(CH_2)_f-$  Brücke (mit c und d in der Bedeutung einer Zahl von 1 bis 4, e und f einer Zahl von 1 bis 6 und g einer Zahl von 1 bis 12) bedeuten,

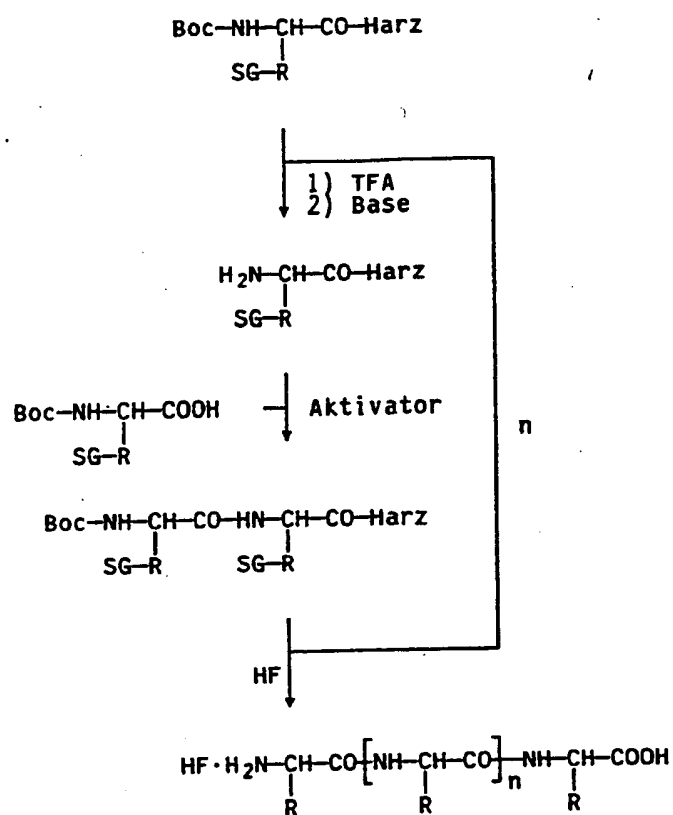
5

sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.

2. Peptide gemäß Anspruch 1, worin G ein Wasserstoffatom oder eine Aminoschutzgruppe und Z eine Hydroxy- oder Aminogruppe oder eine Carboxylschutzgruppe darstellen und M und Q nicht miteinander verbunden sind.  
10
3. Peptide gemäß Anspruch 1, worin G ein Wasserstoffatom oder eine Aminoschutzgruppe und Z eine Hydroxy- oder Aminogruppe oder eine Carboxylschutzgruppe darstellen und M und Q zusammen eine  
15  $-(CH_2)_c-S-S-(CH_2)_d-$  Brücke bedeuten.
4. Peptide gemäß Anspruch 1, worin G ein Wasserstoffatom oder eine Aminoschutzgruppe und Z eine Hydroxy- oder Aminogruppe oder eine Carboxylschutzgruppe darstellen und M und Q zusammen eine Gruppe  
20  $-(CH_2)_e-NH-CO-(CH_2)_f-$  oder  $-(CH_2)_e-NH-CO-(CH_2)_g-NH-CO-(CH_2)_f-$  bedeuten.
5. Peptide gemäß Anspruch 1, worin G + Z zusammen eine kovalente Bindung oder  $-CO-(CH_2)_a-NH-$  bedeuten.
- 25 6. Peptide gemäß Anspruch 1 bis 5 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.
7. Verwendung der Peptide gemäß Ansprüchen 1 bis 5 zur Bekämpfung von neoplastischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen sowie zur  
30 Bekämpfung und Prophylaxe von Infektionen, Entzündungen und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen.
8. Verfahren zur Herstellung der Peptide gemäß Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man diese nach in der Peptidchemie bekannten  
35 Methoden herstellt.



Abb. 1: Die Boc-Schutzgruppentechnik am polymeren Träger



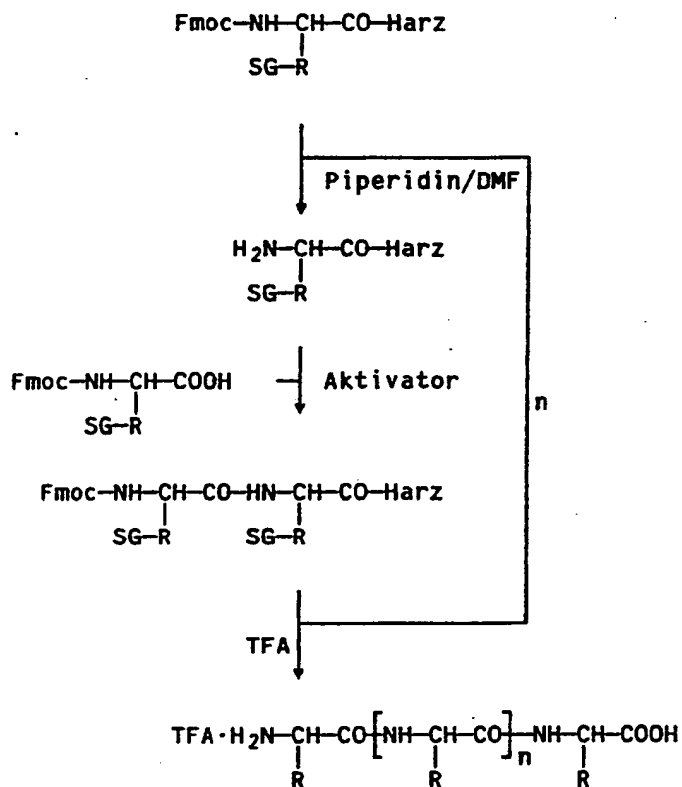
Boc = t-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe

SG = Seitenketten-Schutzgruppe

5 R = Aminosäure-Seitenkette

2/2

Abb. 2: Die Fmoc-Schutzgruppentechnik am polymeren Träger



Fmoc = 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe

SG = Seitenketten-Schutzgruppe

5 R = Aminosäure-Seitenkette